



REÇU 27 SEP. 2004

OMPI

PCT

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 25 JUIN 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

BEST AVAILABLE COPY



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*02

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



19 JUIN 2003

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 © W / 010801

<b>1</b> INPI PARIS <small>Réservé à l'INPI</small> REMISE EN DÉPÔT DATE LIEU N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI Vos références pour ce dossier (facultatif) 32412/FR		<b>2</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  BREESE-MAJEROWICZ 3 avenue de l'Opéra 75001 PARIS																					
<b>3</b> Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie		<b>4</b> NATURE DE LA DEMANDE Cochez l'une des 4 cases suivantes <table border="1"> <tr> <td>Demande de brevet</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>N°</td> <td>Date</td> </tr> <tr> <td>Demande de certificat d'utilité</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>N°</td> <td>Date</td> </tr> <tr> <td>Demande divisionnaire</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>N°</td> <td>Date</td> </tr> <tr> <td>Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>N°</td> <td>Date</td> </tr> <tr> <td>Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>N°</td> <td>Date</td> </tr> </table>		Demande de brevet	<input checked="" type="checkbox"/>	N°	Date	Demande de certificat d'utilité	<input type="checkbox"/>	N°	Date	Demande divisionnaire	<input type="checkbox"/>	N°	Date	Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale	<input type="checkbox"/>	N°	Date	Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale	<input type="checkbox"/>	N°	Date
Demande de brevet	<input checked="" type="checkbox"/>	N°	Date																				
Demande de certificat d'utilité	<input type="checkbox"/>	N°	Date																				
Demande divisionnaire	<input type="checkbox"/>	N°	Date																				
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale	<input type="checkbox"/>	N°	Date																				
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale	<input type="checkbox"/>	N°	Date																				
<b>5</b> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt et protéine produite																							
<b>6</b> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»																					
<b>7</b> DEMANDEUR (cochez l'une des 2 cases) <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique		INSERM																					
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF		101 rue de Tolbiac 75013 PARIS Cedex 13 France France																					
Domicile ou siège Rue Code postal et ville Pays		101 rue de Tolbiac 75013 PARIS Cedex 13 France France																					
Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)																					
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»																							

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page



BEST AVAILABLE COPY

BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

BR2

19 JUIN 2003

REMISE DES PIÈCES	Réservé à l'INPI
DATE	0307411
LIEU	
N° D'ENREGISTREMENT	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

DB 540 @ W / 010801

Vos références pour ce dossier : (facultatif)		32412/FR
<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		
Nom		BREESE
Prénom		Pierre
Cabinet ou Société		BREESE-MAJEROWICZ
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	3 avenue de l'Opéra
	Code postal et ville	75 001 Paris
	Pays	France
N° de téléphone (facultatif)		01 47 03 67 77
N° de télécopie (facultatif)		01 47 03 67 78
Adresse électronique (facultatif)		office@breese.fr
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Païement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) BREESE Pierre 921038		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> MME BLANCANEUX

**BEST AVAILABLE COPY**



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**19 JUIN 2003**

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Page suite N° 1.../1...



REMISE DES PIÈCES  
DATE  
LIEU  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

**75 INPI PARIS**  
**0307411**

Réservé à l'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 @ W / 180601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		32412/FR
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N°
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS-
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Code APE-NAF		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Domicile ou siège	Rue	3 rue Michel-Ange
	Code postal et ville	75 15 17 19 14   PARIS Cedex 16
	Pays	France
Nationalité		France
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Code APE-NAF		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Domicile ou siège	Rue	
	Code postal et ville	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
	Pays	
Nationalité		
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>  MME BLANCANEUX

BRESE Pierre

921038

## **Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt et protéine produite.**

L'invention a pour objet un nouveau procédé de production de protéine  
5 d'intérêt, en grande quantité, directement utilisable pour des analyses structurales. L'invention concerne également la protéine recombinante obtenue.

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) constituent une super-famille de protéines membranaires caractérisées par 7 domaines transmembranaires (TM I à VII) qui jouent un rôle primordial dans la  
10 communication intercellulaire et la réception des signaux sensoriels [1].

Avec plusieurs centaines de membres identifiés, les RCPGs constituent la famille structurale et fonctionnelle de récepteurs membranaires la plus importante. Ils représentent notamment une part significative du génome humain connu à ce jour (au moins 700 récepteurs, 0.5 % du génome).

15 Exprimés à la surface de toutes les cellules d'un organisme (de la levure à l'homme), ils sont activés par une très grande variété de messages extracellulaires (peptides, hormones, lipides, molécules odorantes, lumière, nucléotides, nucléosides, molécules du goût, etc...). Leur activation entraîne une cascade intracellulaire de signaux par l'intermédiaire de protéines G et résulte en  
20 un grand nombre de réponses cellulaires (par exemple division ou contraction cellulaire, neurotransmission).

De façon générale, les RCPGs sont impliqués dans chaque fonction physiologique. L'importance de ces récepteurs ainsi que la connaissance de leur localisation cellulaire les désigne comme des cibles idéales de la thérapeutique.  
25 Et effectivement, on peut estimer que près de 50% des médicaments sur le marché agissent via les RCPGs. Beaucoup de pathologies sont la conséquence de mutations des RCPGs, et leurs manifestations cliniques sont bien connues, on peut citer par exemple cécité, diabète insipide néphrogénique, hypo- ou hyperthyroïdisme, puberté précoce, obésité [2].

30 La découverte que certains récepteurs des chémokines sont des cofacteurs de l'infection par le virus HIV renforce l'idée que les RCPGs sont impliqués dans une grande variété de situations pathologiques [3].

Ces considérations générales indiquent clairement la nécessité d'étudier l'architecture fonctionnelle de ces récepteurs, afin de mieux comprendre le processus de transduction du signal et la dynamique de leurs interactions avec diverses molécules (ligands ou partenaires intracellulaires), ainsi que pour  
5 développer de nouveaux outils pharmacologiques et thérapeutiques. Cependant, l'étude de l'architecture fonctionnelle des RCPGs par les méthodes expérimentales « directes » (cristallographie aux rayons X, RMN, spectrométrie de masse) reste encore très limitée. Une seule structure tridimensionnelle (3D) est actuellement connue, celle de la rhodopsine de bœuf [4], du fait du très fort  
10 niveau d'expression naturel de ce récepteur dans la rétine. La connaissance de leur architecture fonctionnelle est donc abordée actuellement par un faisceau de méthodes théoriques (modélisation), physico-chimiques (photomarquage, fluorescence) et biologiques (mutagénèse dirigée, pharmacologie moléculaire, knock-out, etc...).

15 Ces études représentent un enjeu industriel et socio-économique de première importance, compte tenu des applications thérapeutiques potentielles.

Cependant l'étude structurale et fonctionnelle des RCPGs est très difficile pour diverses raisons :

- la nature transmembranaire de ces protéines et leur caractère  
20 hydrophobe rendent leur manipulation délicate et conduisent en général à une perte de la fonctionnalité et à une dénaturation après solubilisation ;

- les obtenir dans la totalité de leur séquence primaire reste très difficile. La plupart du temps, ils sont exprimés sous forme tronquée [5].

- ils sont exprimés en quantité très faible (0.01% des protéines  
25 membranaires) ce qui constitue un blocage à leur purification en grande quantité ;

- leur poids moléculaire est élevé (supérieur à 40 kD), et ils sont caractérisés par la présence de modifications post-traductionnelles (glycosylation, palmitoylation, phosphorylation) et de traits structuraux particuliers  
30 (ponts disulfure) ;

- ce sont des protéines multifonctionnelles possédant des domaines avec des rôles différents : liaison des ligands, activation des protéines G, sites allostériques, zones impliquées dans leur régulation / désensibilisation



On comprend aisément que l'étape critique qui constitue actuellement un réel blocage est certainement celle de l'obtention des RCPGs en des quantités compatibles avec les approches de biologie structurale « directes ».

Jusqu'à présent, aucune stratégie de production en grande quantité, généralisable à tous les RCPGs, permettant en outre leur purification sous forme fonctionnelle d'une manière simple, n'a été mise au point. Ponctuellement, certains récepteurs ont été produits en quantité élevée (mg/l de culture) [6-8], mais les méthodes mises en place ne s'appliquent pas à une majorité de RCPGs.

Les RCPGs ne représentent dans ce domaine de la production en grande quantité d'une protéine qu'un exemple des difficultés que l'on rencontre lorsqu'il s'agit d'obtenir une quantité importante d'une protéine d'intérêt. La présente invention a pour but de fournir un procédé de production en grande quantité d'une protéine d'intérêt, particulièrement des RCPGs.

Les inventeurs ont de manière surprenante, montré que la construction de protéines recombinantes, particulièrement de protéines membranaires, très particulièrement de RCPGs, comprenant au moins un fragment d'une intégrine alpha et la protéine d'intérêt, permet d'obtenir des protéines recombinantes pouvant être exprimées en grande quantité. Cette stratégie permet en particulier d'obtenir une production desdites protéine en grande quantité dans des microorganismes, particulièrement dans des bactéries. Lorsque les protéines recombinantes de l'invention sont produites dans des bactéries, elle s'accumulent dans les corps d'inclusion du cytoplasme bactérien. Il est alors nécessaire de renaturer les protéines d'intérêt pour les obtenir sous forme active en une quantité compatible avec une analyse directe de leur structure par exemple par cristallographie aux rayons X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN). Le procédé de l'invention peut permettre en outre la production de protéines non tronquées, particulièrement lorsqu'il est appliqué aux RCPGs.

Les intégrines forment une famille de récepteurs liés structurellement et fonctionnellement qui participent aux interactions cellule-cellule et cellule-matrice extra-cellulaire. Toutes les intégrines se présentent sous forme d'hétérodimères de sous-unités alpha et bêta, liées de manière non covalente. Sur la base de leur séquence primaire, toutes les intégrines alpha présentent une région N-terminale

constituée de sept séquences en acides aminés répétées (répétition I à VII), chacune comprenant approximativement 60 acides aminés. Certaines sous-unités alpha incluent un domaine d'insertion (domaine-I) d'environ 200 acides aminés, situé entre les répétitions II et III. Les homologues entre les répétitions I et VII comprennent essentiellement des séquences consensus FG et GAP, correspondant aux enchaînements phenylalanine, glycyl-glycyl, alanyl, prolyl, d'où leur dénomination « répétition FG-GAP ».

A la connaissance des inventeurs, la sous-unité alpha des intégrines (par ailleurs appelée intégrine alpha (intégrine  $\alpha$ ) dans le texte) n'a jamais été utilisée dans la construction de protéines recombinantes.

Ainsi, l'invention a pour objet premier l'utilisation d'au moins un fragment d'une intégrine alpha dans la construction d'une protéine recombinante d'intérêt. L'invention a aussi pour objet l'utilisation d'au moins un fragment d'une intégrine alpha pour la production d'une protéine recombinante d'intérêt.

Par fragment d'une intégrine alpha, on entend aussi bien la séquence en acide aminé complète de l'intégrine alpha utilisée qu'une séquence partielle. La séquence de l'intégrine alpha utilisée peut être native ou mutée. Préférentiellement selon l'invention, la séquence utilisée est une séquence comprenant l'extrémité N-terminale de l'intégrine alpha utilisée, encore plus préférentiellement une séquence correspondant à l'extrémité N-terminale de l'intégrine alpha utilisée.

Selon un mode particulier de l'invention, le fragment de l'intégrine alpha utilisée comprend au moins les modules FG-GAP IV à VII et une portion du module FG-GAP III de l'intégrine alpha utilisée.

Le fragment de l'intégrine alpha utilisée peut être un fragment de toute intégrine alpha connue. On citera particulièrement les intégrines  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 11$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha E$ ,  $\alpha L$ ,  $\alpha M$ ,  $\alpha X$ ,  $\alpha IIb$  ou encore  $\alpha V$ .

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, on utilise un fragment de 287 acides aminés, correspondant à la partie de l'extrémité N-terminale de l'intégrine alpha 5 qui s'étend entre les positions 231 et 517, selon la numérotation tenant compte de la présence du peptide signal. Si l'on ne tient pas compte du peptide signal, le fragment utilisable dans l'invention s'étend des positions 190 (résidu G) à 476 (résidu G) de l'intégrine alpha5.



Lorsque l'on utilise d'autres intégrines alpha, les fragments utilisables selon l'invention sont les fragments homologues aux fragments ci-dessus définis. Par exemple quand il s'agit de l'intégrine  $\alpha V$ , le fragment utilisable selon l'invention correspond à la partie de l'extrémité N-terminale de l'intégrine  $\alpha V$  qui s'étend des positions 211 (résidu G) à 495 (résidu G) selon la numérotation 5 tenant compte de la présence du peptide signal. Si l'on ne tient pas compte du peptide signal, le fragment utilisable dans l'invention s'étend des positions 181 (résidu G) à 465 (résidu G) de l'intégrine  $\alpha V$ . Quand il s'agit de l'intégrine  $\alpha IIb$ , le fragment utilisable selon l'invention correspond à la partie de l'extrémité N-terminale de l'intégrine  $\alpha IIb$  qui s'étend des positions 224 (résidu G) à 508 (résidu Q), selon la numérotation tenant compte de la présence du peptide signal. Si l'on ne tient pas compte du peptide signal, le fragment utilisable dans l'invention s'étend des positions 193 (résidu G) à 477 (résidu Q) de l'intégrine  $\alpha IIb$ .

Selon un mode particulier de l'invention, le fragment de l'intégrine alpha utilisée comprend au moins une séquence en acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID n°1 (fragment de l'intégrine  $\alpha 5$  humaine), SEQ ID n°2 (fragment de l'intégrine V humaine) et SEQ ID N°3 (fragment de l'intégrine  $\alpha IIb$  humaine), de la liste de séquence fournie en annexe.

Selon un autre mode particulier de l'invention, le fragment de l'intégrine alpha utilisé comprend au moins une séquence en acides aminés codée par l'une des séquences en nucléotides, choisie parmi les séquences SEQ ID N°4 (fragment de l'intégrine  $\alpha 5$  humaine), SEQ ID N°5 (fragment de l'intégrine V humaine) et SEQ ID N°6 (fragment de l'intégrine  $\alpha IIb$  humaine), de la liste de séquence fournie en annexe.

Préférentiellement selon l'invention, le fragment d'intégrine alpha est situé dans la protéine recombinante d'intérêt préparée selon l'invention, en amont de la séquence de la protéine d'intérêt que l'on vise à produire, c'est-à-dire du côté N-terminal de la protéine recombinante d'intérêt que l'on cherche à construire et/ou à produire.

L'invention a également pour objet une protéine recombinante caractérisée en ce qu'elle comprend, fusionnés, au moins un fragment d'une intégrine alpha tel que défini précédemment et une protéine d'intérêt.

La protéine d'intérêt, partie de la protéine recombinante de l'invention, peut être toute protéine que l'on cherche à produire, particulièrement une protéine membranaire, très particulièrement un récepteur couplé aux protéines G (RCPGs). A titre d'exemple pour ces derniers, on peut citer les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine (V1a, V2, OTR), les récepteurs des leucotriènes (BLT1, BLT2, CysLT1, CysLT2), les récepteurs adrénergiques (bêta 3), les récepteurs canabinoïdes (CB1).

La protéine recombinante de l'invention peut en outre comprendre toute séquence en acides aminés qui permet de la purifier de manière aisée. Ainsi selon un mode particulier de l'invention, la protéine recombinante une séquence de 6 résidus histidine (tag 6xHIS). Ce tag 6xHIS est incorporé dans la séquence de la protéine en vue de sa purification sur colonne de Ni-NTA (Nickel-nitrilotriacetic acid) agarose. Préférentiellement, cette séquence est à l'extrémité C-terminale de la protéine recombinante de l'invention.

De manière avantageuse, la séquence codant pour les derniers résidus de l'intégrine est mutée pour constituer un site de clivage pour une endoprotéase (facteur Xa, thrombine), qui permettra après expression et purification de la protéine recombinante, de séparer la protéine d'intérêt de son partenaire de fusion. Selon une forme de réalisation particulière de l'invention, le résidu L (position 285) peut être modifié par mutation en un résidu I, les résidus E et G (positions 286 et 287) étant conservés. Un résidu R supplémentaire peut être introduit par mutagenèse. L'enchaînement ainsi constitué (IEGR) correspond au site de clivage par le facteur Xa qui coupe la protéine après le résidu R.

Sous une autre forme de réalisation, le site de clivage au facteur Xa peut être transformé en un site de clivage à la thrombine. Pour cela les résidus I, E, et G peuvent être remplacés par des résidus L, V et P. Le résidu R est conservé afin d'obtenir l'enchaînement LVPR. Comme le fragment intégrine a été incorporé dans le vecteur côté 3' par un site BamH1 (séquence ggatcc), on obtient donc la séquence ggatcc codant pour deux résidus G et S juste après LVPR. L'enchaînement LVPRGS constitue le site de clivage à la thrombine, qui coupe la protéine après le résidu R.

On comprend donc que dans sa forme la plus élaborée, la protéine recombinante de l'invention comprend, de son extrémité N-Terminale à son



extrémité C-Terminale, le fragment d'intégrine alpha comportant le site de clivage par une endoprotéase, la protéine d'intérêt et le tag 6xHIS.

5        Sous une forme particulière, la protéine recombinante de l'invention comprend, de son extrémité N-Terminale à son extrémité C-Terminale, le fragment d'intégrine alpha comportant le site de clivage par le facteur Xa, la protéine d'intérêt et le tag 6xHIS.

10       Sous une autre forme particulière, la protéine recombinante de l'invention comprend, de son extrémité N-Terminale à son extrémité C-Terminale, le fragment d'intégrine alpha comportant le site de clivage par la thrombine, la protéine d'intérêt et le tag 6xHIS.

15       L'invention a encore pour objet l'utilisation d'au moins un fragment d'une séquence en nucléotides codant pour au moins un fragment d'une intégrine alpha tel que défini précédemment, dans la construction d'une séquence en nucléotides codant pour une protéine recombinante d'intérêt, telle que définie précédemment.

          L'invention a aussi pour objet l'utilisation d'au moins un fragment d'une séquence en nucléotides codant pour au moins un fragment d'une intégrine alpha tel que défini précédemment, pour la production d'une protéine recombinante d'intérêt telle que définie précédemment.

20       L'invention a en outre pour objet une séquence en nucléotides codant pour une protéine recombinante d'intérêt comprenant au moins un fragment d'une séquence en nucléotides codant pour au moins un fragment d'une intégrine alpha, tel que défini précédemment, et une séquence en nucléotides codant pour une protéine d'intérêt, telle que définie précédemment.

25       Préférentiellement, la séquence en nucléotides codant pour au moins un fragment d'une intégrine alpha utilisable selon l'invention ou comprise dans la séquence en nucléotides codant pour une protéine recombinante d'intérêt selon l'invention, peut être choisie parmi les séquences en nucléotides SEQ ID n°4, SEQ ID n°5 et SEQ ID N°6, de la liste de séquence fournie en annexe.

30       L'invention a encore pour objet un vecteur comprenant une séquence en nucléotides codant pour une protéine recombinante d'intérêt, telle que définie précédemment, comprenant au moins un fragment d'une séquence en nucléotides codant pour au moins un fragment d'une intégrine alpha et une

séquence en nucléotides codant pour une protéine. Le vecteur peut être un vecteur eucaryote tel qu'un plasmide ou un virus. Le vecteur peut aussi être tout vecteur procaryote tel qu'un plasmide ou un phage.

De préférence, le vecteur est un vecteur d'expression, c'est-à-dire capable de permettre la transcription et la traduction de la séquence en nucléotides qu'il contient.

A titre d'exemple, il est possible de citer les vecteurs de la famille pET vendu par la société Novagen ou ceux de la famille pGEX vendus par la société AmershamBiosciences.

10 L'invention a encore pour objet une cellule dans laquelle une séquence en nucléotides codant pour une protéine recombinante d'intérêt, telle que définie précédemment, a été introduite. Selon un mode particulier de l'invention, la séquence a été introduite sous la forme d'un vecteur tel que défini précédemment.

15 Par cellule, on entend ici aussi bien une cellule eucaryote qu'une cellule procaryote, particulièrement une bactérie. Toute bactérie capable de permettre l'expression d'une protéine à partir d'une séquence en nucléotide peut être utilisée selon l'invention. A titre d'exemple, il est possible de citer toutes les bactéries qui dérivent de BL21, BL21 star, Rosetta, BLR, Origami, Tuner, 20 Novablue, toute disponible commercialement.

L'invention a encore pour objet un procédé de production d'une protéine d'intérêt, caractérisé en ce que dans une première étape on introduit dans une cellule une séquence en nucléotides codant pour une protéine recombinante d'intérêt, telle que définie précédemment, et que dans une deuxième étape on 25 place la cellule dans des conditions suffisantes pour permettre l'expression de la protéine recombinante d'intérêt.

Le procédé de l'invention peut en outre comprendre une étape supplémentaire au cours de laquelle la protéine recombinante d'intérêt peut être coupée par action d'une endoprotéase, (facteur Xa, thrombine, par exemple), au 30 site créé dans les derniers résidus de l'intégrine afin de séparer la protéine d'intérêt de son partenaire de fusion.

Le procédé de l'invention peut également comprendre une étape supplémentaire au cours de laquelle la protéine recombinante d'intérêt, ou la protéine d'intérêt séparée de son partenaire de fusion, peut être purifiée.

Selon le procédé de l'invention, la séquence en nucléotides codant pour  
5 une protéine recombinante d'intérêt peut-être introduite dans la cellule par toute méthode connue. A titre d'exemple de méthodes utilisables, il est possible de citer pour les cellules procaryotes, le choc thermique ou l'électroporation. Pour les cellules eucaryotes, on peut citer l'électroporation, la méthode du précipité au phosphate de calcium, l'utilisation de polymères cationiques tels que le DEAE-  
10 dextran ou encore toute méthode utilisant des liposomes cationiques ou des dendrimères activés. On peut aussi utiliser des rétrovirus pour faire du transfert de gènes ainsi que les techniques utilisant des microprojectiles pour délivrer de l'ADN dans des cellules cibles.

De même, toute condition suffisante permettant l'expression de la protéine  
15 recombinante d'intérêt, connues de l'homme du métier, sont utilisables selon le procédé de l'invention.

Enfin, toute méthode de purification de la protéine, connue de l'homme du métier, peut être utilisée selon le procédé de l'invention. A titre d'exemple, on peut citer les méthodes de chromatographie d'affinité, de chromatographie  
20 d'échange d'ions, de chromatographie d'interaction hydrophobes ou encore de filtration sur tamis moléculaire.

Particulièrement, lorsque la protéine recombinante d'intérêt comprend le tag 6xHIS, la purification sur colonne Nickel-acide nitrilotriacétique agarose (Ni-NTA) représente une méthode de purification particulièrement satisfaisante dans  
25 le cadre du procédé de l'invention.

Les techniques utilisables selon l'invention sont connues de l'homme du métier. Celui-ci peut se référer aux nombreux manuels disponibles et en particulier à "Molecular Cloning, a laboratory manual. 2nd édition, Sambrook, Fritsch, Maniatis eds., CSH laboratory press, (1989)".

30 Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de l'Invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :



La Figure 1 représente une construction correspondant à un vecteur selon l'invention.

La Figure 2 représente la production de la protéine de fusion intégrine  $\alpha 5$ -récepteur V2 de la vasopressine selon le procédé de l'invention (colonne de gauche : poids moléculaires des protéines de l'échantillon marqueur ; flèche : position de la protéine recombinante intégrine  $\alpha 5$ -récepteur V2 de la vasopressine, NI : protéines d'un échantillon non-induit, 2h, 3h et 4h : protéines d'un échantillon induit après 2h, 3h et 4h d'induction).

La Figure 3 représente la protéine recombinante intégrine  $\alpha 5$ -récepteur V2 de la vasopressine de la figure 2 après purification et migration sur gel d'électrophorèse. (colonne de gauche : poids moléculaires des protéines de l'échantillon marqueur ; flèche : position de la protéine recombinante intégrine  $\alpha 5$ -récepteur V2 de la vasopressine)

Les exemples suivants sont illustratifs de l'invention et ne la limitent aucunement

**Exemple 1 :** Construction d'un vecteur permettant l'expression dans les bactéries d'une protéine recombinante d'intérêt :

Un ADN complémentaire codant pour la protéine d'intérêt que l'on veut exprimer, est positionné, dans le vecteur pET21a (+) (vendu par la société Novagen) en phase avec un fragment d'ADN complémentaire de l'intégrine  $\alpha 5$ , par l'utilisation de sites de restriction appropriés. Le fragment de l'intégrine  $\alpha 5$  est délimité par les sites NdeI et BamHI. Le site NdeI a l'avantage d'incorporer un codon ATG qui est le codon initiateur de la traduction. Ce codon initiateur code pour une méthionine (M). Le site NdeI constitué par la séquence CATATG est donc intéressant pour sous-cloner un fragment d'ADN puisque la séquence cible se trouve directement en phase avec le codon ATG. Celui-ci constitue alors le résidu 1. En ce qui concerne l'intégrine  $\alpha 5$ , l'ATG du site NdeI est positionné en amont de sa séquence nucléotidique. Dans ce cas, l'ATG codera pour une M1 et le G de l'intégrine sera le résidu 2. Le fragment de 287 résidus sera couplé à la méthionine 1 et on obtient donc un partenaire de fusion de 288 résidus : M1-G288.

Le vecteur fournit directement la séquence codant pour le tag 6xHIS qui sera localisé à l'extrémité C-terminale de la protéine recombinante d'intérêt. Un site EcoRI est localisé dans le vecteur du côté de l'extrémité N-terminale du site tag. Ainsi l'ADN complémentaire codant pour la protéine d'intérêt est inséré entre le site Bam HI marquant l'extrémité C-terminale du fragment d'ADN complémentaire de l'intégrine  $\alpha 5$  et le site EcoRI situé du côté de l'extrémité N-terminale du tag 6xHIS.

La figure 1 montre le schéma d'une telle construction.

## Exemple 2 : Expression du récepteur V2 humain de la vasopressine :

### Construction du vecteur :

L'ADN complémentaire du récepteur V2 humain de la vasopressine (Cotte et al., J. BIOL. Chem. 273, 29462-29468, 1998), est inséré entre les sites BamHI et EcoRI du vecteur obtenu à l'exemple 1.

Etape 1 : Préparation de l'ADN complémentaire du récepteur V2 humain de la vasopressine :

Des sites de reconnaissances pour les enzymes de restriction BamHI et EcoRI sont ajoutés de part et d'autre de la séquence de l'ADN complémentaire du récepteur V2 humain de la vasopressine. Cela est réalisé par la technique de PCR classique. L'ADN complémentaire du récepteur V2 humain de la vasopressine est amplifié à partir du vecteur pRK5-V2, (Cotte et al., J. BIOL. Chem. 273, 29462-29468, 1998), à l'aide de deux oligonucléotides amorces permettant d'insérer les sites de restriction recherchés :

oligo sens (permet l'incorporation du site BamHI) : 5' ATG GGT CGC GGA TCC ATG CTC ATG GCG TCC ACC ACT TCC 3'

oligo antisens (permet l'incorporation du site EcoRI) : 5' CGA CGG AAT TCT GCG ATG AAG TGT CCT TGG CCA G 3'.

La réaction de PCR est réalisée dans 50 microlitres d'un mélange réactionnel comprenant :

- pRK5-V2	20 ng
- oligo sens	100 ng
- oligo antisens	100 ng
- Pfu Turbo polymerase (Stratagene)	2.5 U

- tampon Pfu 10X (Stratagene) 5 µl
- dNTP 80 µM final pour chacun des 4

selon les paramètres de cycle suivants :

- dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes puis
- 5 - 25 cycles : 95°C, 30 secondes puis 55°C, 1 minute, 72°C, 1,5 minutes puis
- élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

La présence du fragment amplifié (fragment PCR V2 amplifié) est contrôlée sur gel agarose 1%.

10 Etape 2 : Purification du fragment amplifié (fragment PCR V2 amplifié) :

La zone du gel d'agarose où l'on visualise le fragment d'ADN amplifié est découpée et l'ADNc est purifié à l'aide du kit de purification Qiaquick gel extraction kit (référence Qiagen 28706), en suivant strictement le protocole préconisé par le fournisseur.

15 Etape 3 : Coupure du fragment PCR V2 amplifié par les enzymes BamHI et EcoRI :

Cela est réalisé en une seule étape à l'aide des enzymes vendues par New England Biolabs (NEB) par une incubation de 3 heures à 37°C, dans un volume final de 50 microlitres contenant :

- |    |  |       |
|----|--|-------|
| 20 | - insert V2 (fragment amplifié) 100 à 200 ng | 24 µl |
|    | - tampon EcoRI 10X NEB                       | 5 µl  |
|    | - sérum albumine bovine NEB 100X (10 mg/ml)  | 1 µl  |
|    | - EcoRI ( 40 U )                             | 2 µl  |
|    | - BamHI ( 40 U )                             | 2 µl  |
| 25 | - eau  | 16 µl |

En fin de réaction, les deux enzymes sont inactivées par chauffage à 80°C. pendant 20 minutes.

Le fragment PCR V2 est alors purifié à partir d'un gel d'agarose 1% selon le protocole décrit ci-dessus.

30 Etape 3 : sous-clonage du fragment PCR V2 amplifié dans les sites BamHI et EcoRI du vecteur pET21a de l'exemple 1 :

La ligation est réalisée par incubation à température ambiante (20-25°C) pendant 4 heures dans un milieu comprenant :



- fragment PCR V2 BamHI / EcoRI (100 à 200 ng) 8  $\mu$ l
- vecteur pET21a (30 ng) coupé par BamHI / EcoRI 3  $\mu$ l
- tampon ligase 10X (NEB) 2.5  $\mu$ l
- T4 DNA ligase (NEB) 2  $\mu$ l
- 5 - eau 9.5  $\mu$ l.

Le produit de ligation, protéine de fusion intégrine-récepteur V2 humain de la vasopressine, est ensuite utilisé pour une transformation des bactéries Rosetta (DE3) afin de réaliser les tests d'expression du récepteur.

10 Introduction du vecteur d'expression dans une bactérie et expression de la protéine d'intérêt :

Transformation :

15 Le vecteur obtenu précédemment est ensuite introduit dans une bactérie de souche Rosetta (DE3) par la technique du choc thermique en suivant le protocole de transformation préconisé par le fournisseur, en l'occurrence Novagen.

20 20  $\mu$ l de bactéries Rosetta (DE3) référence Novagen 70954-4 et 1  $\mu$ l de pET21a-intégrine/V2 (quelques nanogrammes) sont incubés sur glace 30 minutes, puis maintenus à 42°C pendant 30 secondes et de nouveau sur glace pendant 2 minutes pour réaliser un choc thermique.

20 80  $\mu$ l de milieu SOC (voir composition dans Molecular Cloning, a laboratory manual. 2nd édition, Sambrook, Fritsch, Maniatis eds. CSH laboratory press, 1989) sont alors ajoutés, puis l'ensemble est incubé à 37°C pendant 1 heure sous agitation à 300 tours/minutes.

25 Le milieu d'incubation est alors étalé sur boîtes de pétri contenant du milieu LB agar + ampicilline à 100 microgrammes / ml. Les boîtes sont incubées à 37°C 16 heures. Les bactéries d'une colonie sont alors cultivées à 37°C dans 10 ml de milieu LB contenant 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline (ou de son analogue la carbenicilline), et la suspension cellulaire est agitée à 300 tours/minutes.

Expression de la protéine :

30 Lorsque la densité optique de la culture atteint 0.6 U, l'expression de la protéine recombinante est induite par addition d'IPTG 1 mM.

Des échantillons sont prélevés 2, 3 ou 4 heures après induction. Pour cela, 1 ml de suspension bactérienne, à densité optique de 0,6, est prélevé dans

chaque culture. L'échantillon est centrifugé pendant 2 minutes à 12000 tours par minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 60 µl de tampon de lyse (25 mM Tris, pH8,3, 185 mM glycine, 0,1% SDS). 60 µl de tampon de dépôt au SDS (10% glycérol, 5% 2-mercaptoethanol, 25 mM Tris-HCl, pH 6,5, 8% SDS, bleu de bromophénol (quelques grains)) sont alors ajoutés et 10 µl de l'échantillon lysé (extraits protéiques totaux) sont alors déposés sur gel d'acrylamide/bis-acrylamide 12% - SDS 0.1 %. Après migration des protéines, elles sont colorées au bleu de Coomassie selon les techniques habituelles.

La Figure 2 représente les résultats obtenus. Les échantillons induits sont comparés à des contrôles non induits (NI) mais ayant été cultivés pendant un temps équivalent. Il est évident que la protéine de fusion α5-récepteur V2, qui présente un poids moléculaire apparent autour de 65 kDa, constitue une des protéines majoritaires de la bactérie, ce qui est une condition requise pour une purification du récepteur en quantité compatible avec des analyses de sa structure via des approches de cristallographie ou RMN.

1 ml de culture ainsi réalisée a permis d'obtenir environ 3 µg de récepteur de la vasopressine.

#### **Exemple 3 : Expression d'autres récepteurs :**

Le résultat obtenu à l'exemple 2 a été reproduit avec la même efficacité, pour d'autres RCPGs, tels que le récepteur β3-adrénergique, les récepteurs BLT2, Cys-LT1 et Cys-LT2 des leucotriènes LTB4, LTD4 et LTC4, le récepteur cannabinoïde de type 1, le récepteur V1a de la vasopressine et le récepteur de l'ocytocine.

**Exemple 4 : Purification de la protéine de fusion fragment d'intégrine α5-récepteur V2 de la vasopressine obtenu à l'exemple 2 :**

La méthode utilisée est celle décrite par Porath J. et collaborateurs, (Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. Nature 258, 598-599, 1975)

L'exemple exposé ici est un essai qui a permis de purifier 3 mg de protéine fusion à partir d'une culture bactérienne de 100 ml.

Une colonie isolée sur LB agar + Ampicilline (100 µg / ml) est piquée et cultivée dans 10 ml de milieu de culture LB + carbenicilline (100 µg / ml). La culture est réalisée à 37°C, sous agitation à 300 tours par minute. Lorsque la

densité optique de la culture atteint 0,6, la culture est arrêtée et conservée au réfrigérateur (cet échantillon est appelé préculture). Le lendemain, dans un Erlenmeyer de 500 ml, 100 ml de milieu de culture LB + carbenicilline (100 µg / ml) sontensemencés avec 2 ml de préculture et laissé 37°C, à 300 tours par minute jusqu'à ce que la densité optique de la culture ait atteint 0,6. 0,1 mM d'IPTG sont alors ajoutés à la culture afin d'induire l'expression de la protéine recombinante. La culture est poursuivie environ 3 heures, jusqu'à obtention d'un densité optique de 2,4 (facteur de stimulation de 4).

La culture est alors centrifugée à 4000 tours par minute pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot peut être lysé directement ou conservé à -80°C.

Pour la lyse, le culot est repris par homogénéisation à la pipette dans 6 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8,00 + inhibiteurs de protéases (leupeptine 5 µg / ml ; benzamidine 10 µg / ml et PMSF 10 µg / ml). Ces trois inhibiteurs de protéases seront incorporés à tous les tampons utilisés par la suite.

Les bactéries sont lysées par sonication à l'aide d'une microsonde conique Branson (duty cycle 50%, output control 5, fréquence 1 burst par seconde pendant 30 secondes, puis repos 30 secondes ; ce cycle est répété 5 fois). Le tube est conservé dans la glace pendant la sonication. Le milieu est alors centrifugé pendant 30 minutes à 15000 tours par minute à 4°C. Le surnageant est conservé pour contrôle sur gel d'électrophorèse.

Le culot contient la protéine d'intérêt puisque celle-ci est accumulée en corps d'inclusion.

Le culot est repris par homogénéisation à la pipette dans 5 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8,00. Les étapes de lyse et de centrifugation sont répétées une fois.

Les surnageants des centrifugations sont conservés pour contrôle sur gel d'électrophorèse.

Le culot est repris par homogénéisation à la pipette dans 5 ml de Tris-HCl, pH 8,00, urée 1M. Un barreau aimanté est placé dans l'échantillon et celui-ci est agité doucement pendant 1h30. Le tube est conservé dans la glace pendant cette étape qui correspond à un lavage des corps d'inclusion et permet d'éliminer des protéines membranaires ou cytoplasmiques associées aux corps d'inclusion

mais qui sont considérées comme contaminantes par rapport à la protéine recombinante.

L'ensemble est alors centrifugé à 15000 tours par minute pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est conservé pour contrôle sur gel d'électrophorèse.

Afin de solubiliser les corps d'inclusion et donc la protéine d'intérêt, le culot est repris par homogénéisation à la pipette dans 5 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8,00, urée 6M, SDS 0.2%.

Un barreau aimanté est placé dans l'échantillon et celui-ci est agité doucement pendant 3 heures, dans la glace.

La protéine d'intérêt (la protéine de fusion fragment d'intégrine  $\alpha 5$ -récepteur V2 de la vasopressine) est alors complètement dénaturée.

L'ensemble est alors centrifugé à 15000 tours par minute pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant contient la protéine d'intérêt et constitue l'échantillon qui sera mis en contact avec la résine Ni-NTA (Nickel-nitriloacetic acid) afin de purifier la fusion  $\alpha 5$ -V2 par chromatographie d'affinité.

3 ml de résine Ni-NTA agarose Superflow (Qiagen, ref 30430) sont équilibrés dans du Tris-HCl 20 mM, pH 8,00, urée 6M, SDS 0,2%, NaCl 150 mM, imidazole 5 mM. On rajoute dans l'échantillon contenant la protéine d'intérêt une quantité suffisante de NaCl et d'imidazole pour obtenir une concentration finale de 150 mM de NaCl et de 5 mM d'imidazole. L'échantillon et la résine sont mis en contact et on laisse incuber à 4°C pendant 16 heures et sous agitation douce. Le mélange échantillon/résine est déposé dans une colonne plastique. On laisse Après la décantation, la fraction "flowthrough" est récupérée à un débit faible, pour contrôle sur gel d'électrophorèse.

La résine est alors lavée avec 3 x 9 ml d'une solution de Tris-HCl 20 mM, pH 8,00, urée 6M, SDS 0,2%, NaCl 150 mM, imidazole 20 mM, pour éliminer toutes les protéines non retenues de façon spécifique sur les groupements Nickel. Les éluats de lavage sont conservés pour contrôle sur gel d'électrophorèse.

La protéine d'intérêt est alors détachée de la résine par passage de 3 ml d'une solution de Tris-HCl 20 mM pH 8,00, urée 6M, SDS 0,2%, NaCl 150 mM,



imidazole 100 mM. Un aliquot de la protéine purifiée est conservé pour contrôle sur gel d'électrophorèse.

10 µl du milieu contenant la protéine purifiée sont mélangés à 10 µl de tampon de dépôt au SDS et l'ensemble est déposé sur un gel d'électrophorèse.

5 10 µl d'échantillon purifié contiennent de 5 à 10 µg de protéine soit dans 3 ml d'éluat, 1,5 à 3 mg de protéine recombinante.

La figure 3 montre la protéine purifiée déposée sur gel d'électrophorèse.

10 L'échantillon purifié est dialysé contre une solution de Tris-HCl 20 mM, pH 8,00, urée 6M, NaCl 150 mM pour éliminer le SDS et l'imidazole. Pour cela, l'échantillon est placé dans une cassette de dialyse Pierce (membrane de MWCO de 10000) et la dialyse se fait dans un Becher contenant un litre du tampon. La dialyse est effectuée à 4°C pendant au moins 24 heures.

15 L'échantillon est récupéré et la quantité de protéine d'intérêt obtenue est dosée par mesure d'absorption (excitation à 280 nM, absorption entre 235 et 500 nM). En général, on obtient une D.O de 1 à 1.5, ce qui est équivalent à une concentration de 0.5 à 1 mg / ml, ce qui est équivalent à une concentration de l'ordre de 10 µM.

La protéine purifiée et dénaturée (car solubilisée dans l'urée 6M) est utilisée pour les essais de renaturation.

## Références

1. Bockaert J. and Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors : an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723-1729, 1999.
- 5        2. Bockaert J. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires : physiologie et pathologie de la transduction. *Médecine/Sciences* 11, 382-394, 1995.
3. Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.M., Saragosti S., Lapoumeroulie C., Cognaux J., Forceille C., Muyldermans G.,  
 10        Verhofstede C., Burtonboy G., Georges M., Imai T., Rana S., Yi Y., Smyth R.J., Collman R.G., Doms R.W., Vassart G. and Parmentier M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382, 722-725, 1996.
4. Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke CA., Motoshima H., Fox  
 15        BA., LeTrong I., Teller DC., Okada T., Stenkamp RE., Yamamoto M. and Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745, 2000.
5. Kiefer H., Vogel R. and Maier K. Bacterial expression of G protein-coupled receptors : prediction of expression levels from sequence. *Receptors and Channels* 7, 109-119, 2000.  
 20
6. Tucker J. and Grisshammer R. Purification of rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J.*, 317, 891-899, 1996.
7. Kiefer H., Krieger J., Olszewski JD., Von Heijne G., Prestwich GD. And Breer H. Expression of an olfactory receptor in *Escherichia coli* : purification, reconstitution and ligand binding. *Biochemistry* 35, 16077-16084, 1996.  
 25
8. Wei HM. and Grisshammer R. Purification and characterization of the human adenosine A<sub>2a</sub> receptor functionally expressed in *escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 269, 82-92, 2002.



## REVENDEICATIONS

- 1) Utilisation d'au moins un fragment d'une intégrine alpha dans la construction d'une protéine recombinante d'intérêt.
- 5 2) Utilisation d'au moins un fragment d'une intégrine alpha pour la production d'une protéine recombinante d'intérêt.
- 3) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le fragment d'intégrine alpha est une séquence en acide aminé complète de l'intégrine alpha ou une séquence partielle.
- 10 4) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le fragment d'intégrine alpha est une séquence comprenant l'extrémité N-terminale de l'intégrine alpha utilisée.
- 5) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'intégrine alpha est native ou mutée.
- 15 6) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le fragment d'intégrine alpha comprend au moins les modules FG-GAP IV à VII et une portion du module FG-GAP III de l'intégrine alpha utilisée.
- 7) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le fragment d'intégrine alpha provient d'une
- 20 intégrine alpha choisie parmi les intégrines  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 11$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha E$ ,  $\alpha L$ ,  $\alpha M$ ,  $\alpha X$ ,  $\alpha IIb$ , ou encore  $\alpha V$ .
- 8) Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que le fragment d'intégrine alpha provient d'une intégrine alpha choisie parmi les
- 25 intégrines  $\alpha 5$ ,  $\alpha V$  ou  $\alpha IIb$ .
- 9) Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que le fragment de l'intégrine alpha 5 s'étend entre les positions 231 et 517 (en tenant compte de la présence du peptide signal) ou des positions 190 à 476 (en ne tenant pas compte de la présence du peptide signal).
- 30 10) Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que le fragment de l'intégrine  $\alpha V$  s'étend entre les positions 211 et 495 (en tenant compte de la présence du peptide signal) ou des positions 181 à 465 (en ne tenant pas compte de la présence du peptide signal).

11) Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que le fragment de l'intégrine  $\alpha$ IIb s'étend entre les positions 224 et 508 (en tenant compte de la présence du peptide signal) ou des positions 193 à 477 (en ne tenant pas compte de la présence du peptide signal).

12) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le fragment d'intégrine alpha comprend au moins une séquence en acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID n°1, SEQ ID n°2 et SEQ ID N°3 de la liste de séquence fournie en annexe.

13) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que le fragment d'intégrine alpha comprend au moins une séquence en acides aminés codée par l'une des séquences en nucléotides choisie parmi les séquences SEQ ID n°4, SEQ ID n°5 et SEQ ID N°6, de la liste de séquence fournie en annexe.

14) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que le fragment d'intégrine alpha est situé dans la protéine recombinante d'intérêt préparée selon l'invention, en amont de la séquence de la protéine d'intérêt que l'on vise à produire.

15) Protéine recombinante caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment d'une intégrine alpha tel que décrit dans l'une quelconque des revendications 1 à 14 et une protéine d'intérêt.

16) Protéine recombinante selon la revendication 15, caractérisée en ce que la protéine d'intérêt est une protéine membranaire.

17) Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 15 ou 16, caractérisée en ce que la protéine d'intérêt est un récepteur couplé aux protéines G.

18) Protéine recombinante selon la revendication 17, caractérisée en ce que le un récepteur couplé aux protéines G est choisi parmi les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine (V1a, V2, OTR), les récepteurs des leucotriènes (BLT1, BLT2, CysLT1, CysLT2), les récepteurs adrénergiques (bêta 3), les récepteurs canabinoïdes (CB1).

19) Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 15 à 18, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence de 6 résidus histidine (tag 6xHIS).





20) Protéine recombinante selon la revendication 19, caractérisée en ce que la séquence de 6 résidus histidine est à l'extrémité C-terminale de la protéine.

5 21) Utilisation d'au moins un fragment d'une séquence en nucléotides codant pour au moins un fragment d'une intégrine alpha tel que décrit dans l'une quelconque des revendications 1 à 14, dans la construction d'une séquence en nucléotides codant pour une protéine recombinante d'intérêt telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 15 à 20.

10 22) Séquence en nucléotides codant pour une protéine recombinante d'intérêt telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 15 à 20.

23) Vecteur comprenant une séquence en nucléotides telle que décrite à la revendication 22.

15 24) Cellule dans laquelle une séquence en nucléotides telle que décrite à la revendication 22 ou un vecteur tel que décrit à la revendication 23 a été introduit.

20 25) Procédé de production d'une protéine d'intérêt, caractérisé en ce que dans une première étape on introduit dans une cellule une séquence en nucléotides codant pour une protéine recombinante d'intérêt, telle que décrite à la revendication 22, et que dans une deuxième étape on place la cellule dans des conditions permettant l'expression de la protéine recombinante d'intérêt.

25 26) Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une étape supplémentaire au cours de laquelle la protéine recombinante d'intérêt est coupée par action d'une endoprotéase.

30 27) Procédé selon l'une quelconque des revendications 25 ou 26, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une étape supplémentaire au cours de laquelle la protéine recombinante d'intérêt ou la protéine d'intérêt séparée de son partenaire de fusion, est purifiée.

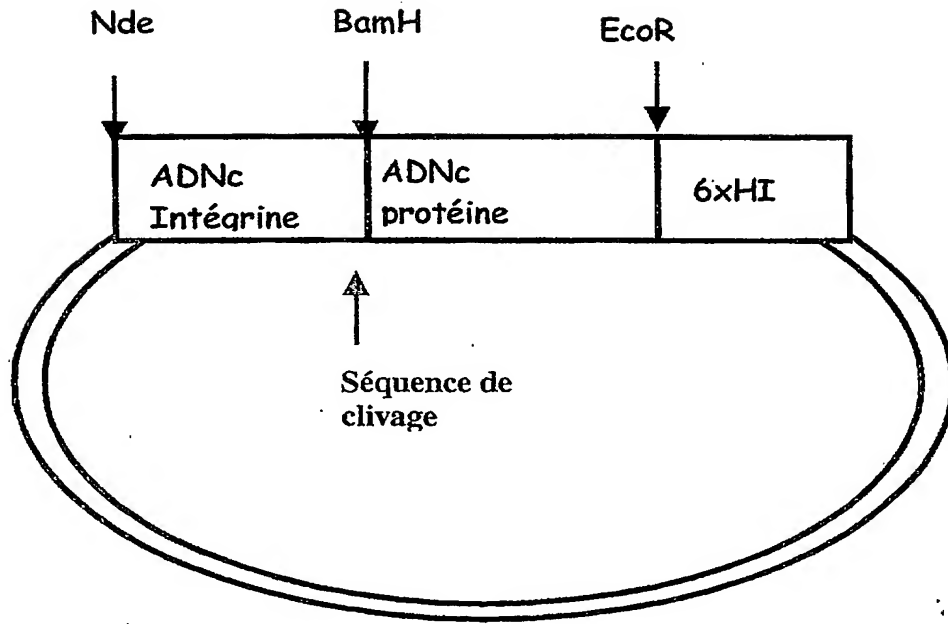


Figure 1

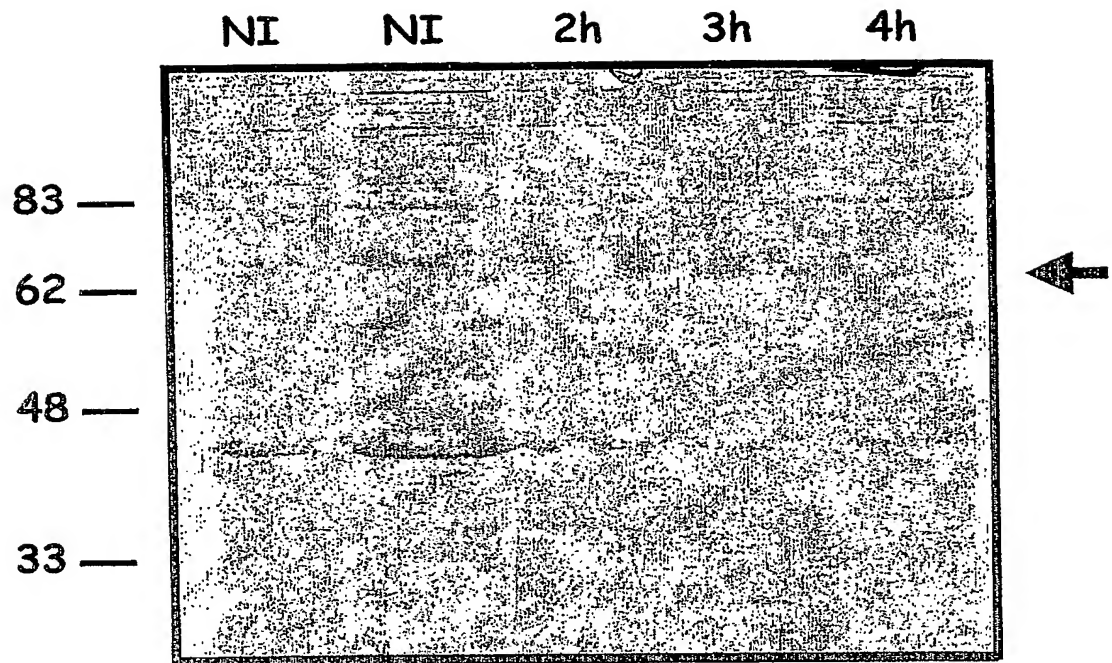


Figure 2

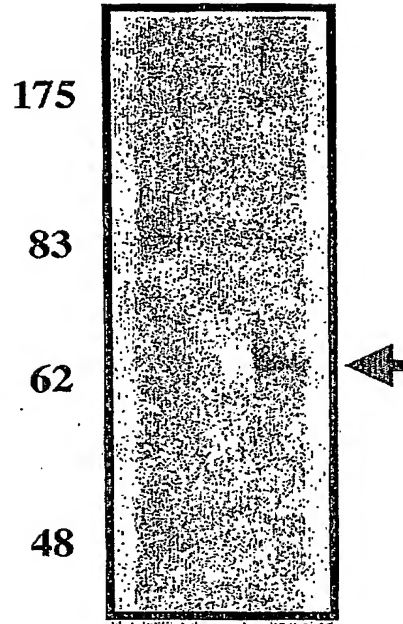


Figure 3



# SEQUENCE LISTING

<110> INSERM  
CNRS

<120> Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt et protéine produite.

<130> 32412-FR

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Gln Ile Leu Ser Ala Thr Gln Glu Gln Ile Ala Glu Ser Tyr  
1 5 10 15

Tyr Pro Glu Tyr Leu Ile Asn Leu Val Gln Gly Gln Leu Gln Thr Arg  
20 25 30

Gln Ala Ser Ser Ile Tyr Asp Asp Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val Ala  
35 40 45

Val Gly Glu Phe Ser Gly Asp Asp Thr Glu Asp Phe Val Ala Gly Val  
50 55 60

Pro Lys Gly Asn Leu Thr Tyr Gly Tyr Val Thr Ile Leu Asn Gly Ser  
65 70 75 80

Asp Ile Arg Ser Leu Tyr Asn Phe Ser Gly Glu Gln Met Ala Ser Tyr  
85 90 95

Phe Gly Tyr Ala Val Ala Ala Thr Asp Val Asn Gly Asp Gly Leu Asp  
100 105 110

Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Leu Leu Met Asp Arg Thr Pro Asp Gly  
115 120 125

Arg Pro Gln Glu Val Gly Arg Val Tyr Val Tyr Leu Gln His Pro Ala  
130 135 140

Gly Ile Glu Pro Thr Pro Thr Leu Thr Leu Thr Gly His Asp Glu Phe  
145 150 155 160

Gly Arg Phe Gly Ser Ser Leu Thr Pro Leu Gly Asp Leu Asp Gln Asp  
165 170 175

Gly Tyr Asn Asp Val Ala Ile Gly Ala Pro Phe Gly Gly Glu Thr Gln  
180 185 190

Gln Gly Val Val Phe Val Phe Pro Gly Gly Pro Gly Gly Leu Gly Ser  
195 200 205

Lys Pro Ser Gln Val Leu Gln Pro Leu Trp Ala Ala Ser His Thr Pro  
210 215 220

Asp Phe Phe Gly Ser Ala Leu Arg Gly Gly Arg Asp Leu Asp Gly Asn  
225 230 235 240

Gly Tyr Pro Asp Leu Ile Val Gly Ser Phe Gly Val Asp Lys Ala Val  
245 250 255

Val Tyr Arg Gly Arg Pro Ile Val Ser Ala Ser Ala Ser Leu Thr Ile  
260 265 270

Phe Pro Ala Met Phe Asn Pro Glu Glu Arg Ser Cys Ser Leu Glu Gly  
275 280 285

<210> 2  
<211> 286  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Gln Leu Ile Ser Asp Gln Val Ala Glu Ile Val Ser Lys Tyr  
1 5 10 15

Asp Pro Asn Val Tyr Ser Ile Lys Tyr Asn Asn Gln Leu Ala Thr Arg  
20 25 30

Thr Ala Gln Ala Ile Phe Asp Asp Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val Ala  
35 40 45

Val Gly Asp Phe Asn Gly Asp Gly Ile Asp Asp Phe Val Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Arg Ala Ala Arg Thr Leu Gly Met Val Tyr Ile Tyr Asp Gly Lys  
65 70 75 80

Asn Met Ser Ser Leu Tyr Asn Phe Thr Gly Glu Gln Met Ala Ala Tyr  
85 90 95

Phe Gly Phe Ser Val Ala Ala Thr Asp Ile Asn Gly Asp Asp Tyr Ala  
100 105 110

Asp Val Phe Ile Gly Ala Pro Leu Phe Met Asp Arg Gly Ser Asp Gly  
115 120 125

Lys Leu Gln Glu Val Gly Gln Val Ser Val Ser Leu Gln Arg Ala Ser  
130 135 140



Gly Asp Phe Gln Thr Thr Lys Leu Asn Gly Phe Glu Val Phe Ala Arg  
145 150 155 160

Phe Gly Ser Ala Ile Ala Pro Leu Gly Asp Leu Asp Gln Asp Gly Phe  
165 170 175

Asn Asp Ile Ala Ile Ala Ala Pro Tyr Gly Gly Glu Asp Lys Lys Gly  
180 185 190

Ile Val Tyr Ile Phe Asn Gly Arg Ser Thr Gly Leu Asn Ala Val Pro  
195 200 205

Ser Gln Ile Leu Glu Gly Gln Trp Ala Ala Arg Ser Met Pro Pro Ser  
210 215 220

Phe Gly Tyr Ser Met Lys Gly Ala Thr Asp Ile Asp Lys Asn Gly Tyr  
225 230 235 240

Pro Asp Leu Ile Val Gly Ala Phe Gly Val Asp Arg Ala Ile Leu Tyr  
245 250 255

Arg Ala Arg Pro Val Ile Thr Val Asn Ala Gly Leu Glu Val Tyr Pro  
260 265 270

Ser Ile Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr Cys Ser Leu Pro Gly  
275 280 285

<210> 3  
<211> 286  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gly Leu Leu Ala Gln Ala Pro Val Ala Asp Ile Phe Ser Ser Tyr  
1 5 10 15

Arg Pro Gly Ile Leu Leu Trp His Val Ser Ser Gln Ser Leu Ser Phe  
20 25 30

Asp Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Phe Asp Gly Tyr Trp Gly Tyr Ser Val  
35 40 45

Ala Val Gly Glu Phe Asp Gly Asp Leu Asn Thr Thr Glu Tyr Val Val  
50 55 60

Gly Ala Pro Thr Trp Ser Trp Thr Leu Gly Ala Val Glu Ile Leu Asp  
65 70 75 80

Ser Tyr Tyr Gln Arg Leu His Arg Leu Arg Ala Glu Gln Met Ala Ser  
85 90 95

Tyr Phe Gly His Ser Val Ala Val Thr Asp Val Asn Gly Asp Gly Arg

100

105

110

His Asp Leu<sup>115</sup> Leu Val Gly Ala Pro<sup>120</sup> Leu Tyr Met Glu Ser Arg Ala Asp<sup>125</sup>

Arg Lys<sup>130</sup> Leu Ala Glu Val Gly<sup>135</sup> Arg Val Tyr Leu Phe<sup>140</sup> Leu Gln Pro Arg

Gly<sup>145</sup> Pro His Ala Leu Gly<sup>150</sup> Ala Pro Ser Leu<sup>155</sup> Leu Thr Gly Thr Gln<sup>160</sup>

Leu Tyr Gly Arg Phe<sup>165</sup> Gly Ser Ala Ile Ala<sup>170</sup> Pro Leu Gly Asp Leu<sup>175</sup> Asp

Arg Asp Gly Tyr<sup>180</sup> Asn Asp Ile Ala Val<sup>185</sup> Ala Ala Pro Tyr Gly<sup>190</sup> Gly Pro

Ser Gly Arg<sup>195</sup> Gly Gln Val Leu Val<sup>200</sup> Phe Leu Gly Gln Ser<sup>205</sup> Glu Gly Leu

Arg Ser Arg<sup>210</sup> Pro Ser Gln Val<sup>215</sup> Leu Asp Ser Pro Phe<sup>220</sup> Pro Thr Gly Ser

Ala Phe Gly Phe Ser<sup>230</sup> Leu Arg Gly Ala Val Asp<sup>235</sup> Ile Asp Asp Asn Gly<sup>240</sup>

Tyr Pro Asp Leu<sup>245</sup> Ile Val Gly Ala Tyr Gly<sup>250</sup> Ala Asn Gln Val Ala<sup>255</sup> Val

Tyr Arg Ala Gln<sup>260</sup> Pro Val Val Lys Ala<sup>265</sup> Ser Val Gln Leu Leu<sup>270</sup> Val Gln

Asp Ser Leu<sup>275</sup> Asn Pro Ala Val Lys<sup>280</sup> Ser Cys Val Leu Pro<sup>285</sup> Gln

<210> 4  
<211> 864  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
atgggccaga tcctgtctgc cactcaggag cagattgcag aatcttatta ccccgagtag 60  
ctgatcaacc tggttcaggg gcagctgcag actcgccagg ccagttccat ctatgatgac 120  
agctacctag gatactctgt ggctgttggt gaattcagtg gtgatgacac agaagacttt 180  
gttgctggtg tgcccaaagg gaacctcact tacggctatg tcaccatcct taatggctca 240  
gacattcgat ccctctacaa cttctcaggg gaacagatgg cctcctactt tggctatgca 300  
gtggccgcca cagacgtcaa tggggacggg ctggatgact tgctgggtggg ggcacccctg 360  
ctcatggatc ggacccctga cgggcggcct caggaggtgg gcagggtcta cgtctacctg 420  
cagcaccag ccggcataga gccacgccc acccttacc tcactggcca tgatgagttt 480





ggccgatttg gcagctcctt gacccccctg ggggacctgg accaggatgg ctacaatgat	540
gtggccatcg gggctccctt tgggtggggag acccagcagg gagtagtggt tgtatttcct	600
gggggcccag gagggctggg ctctaagcct tcccagggtc tgcagcccct gtgggcagcc	660
agccacaccc cagacttctt tggctctgcc cttcgaggag gccgagacct ggatggcaat	720
ggatatcctg atctgattgt ggggtccttt ggtgtggaca aggctgtggt atacaggggc	780
cgccccatcg tgtccgctag tgcctccctc accatcttcc ccgccatggt caaccagag	840
gagcggagct gcagcttaga gggg	864

<210> 5  
 <211> 858  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 5	
atgggtcagc ttatttcgga tcaagtggca gaaatcgat cttaaatacga cccaatggt	60
tacagcatca agtataataa ccaattagca actcggactg cacaagctat ttttgatgac	120
agctatttg gttattctgt ggctgtcgga gatttcaatg gtgatggcat agatgacttt	180
gtttcaggag ttccaagagc agcaaggact ttgggaatgg tttatattta tgatgggaag	240
aacatgtcct cttatacaa ttttactggc gacgagatgg ctgcatattt cggattttct	300
gtagctgcca ctgacattaa tggagatgat tatgcagatg tgtttattgg agcacctctc	360
ttcatggatc gtggctctga tggcaaactc caagaggtgg ggcaggtctc agtgtctcta	420
cagagagctt caggagactt ccagacgaca aagctgaatg gatttgaggt ctttgcacgg	480
tttggcagtg ccatagctcc tttgggagat ctggaccagg atggtttcaa tgatattgca	540
attgctgctc catatggggg tgaagataaa aaaggaattg tttatatctt caatggaaga	600
tcaacaggct tgaacgcagt cccatctcaa atccttgaag ggcagtgggc tgctcgaagc	660
atgccaccaa gctttggcta ttcaatgaaa ggagccacag atatagacaa aaatggatat	720
ccagacttaa ttgtaggagc ttttggtgta gatcgagcta tcttatacag ggccagacca	780
gttatcactg taaatgctgg tcttgaagtg taccctagca ttttaaatca agacaataaa	840
acctgctcac tgcctgga	858

<210> 6  
 <211> 858  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 6	
atgggtctcc tggcccaggc tccagttgcy gatattttct cgagttaccg cccaggcatc	60
cttttgtggc acgtgtctct ccagagcctc tcctttgact ccagcaaccc agagtacttc	120
gacggctact ggggggtactc ggtggccgtg ggcgagttcg acggggatct caacactaca	180
gaatatgtcg tcggtgcccc cacttgagc tggaccctgg gagcgggtgga aattttggat	240
tcctactacc agaggctgca tcggctgcyg gcagagcaga tggcgtcgta ttttgggcat	300

tcagtggctg tcactgacgt caacggggat gggaggcatg atctgctggt gggcgctcca	360
ctgtatatgg agagccgggc agaccgaaaa ctggccgaag tggggcgtgt gtatttgttc	420
ctgcagccgc gaggcccca cgcgctgggt gccccagcc tcctgctgac tggcacacag	480
ctctatgggc gattcggctc tgccatcgca cccctgggcg acctcgaccg ggatggctac	540
aatgacattg cagtggctgc cccctacggg ggtcccagtg gccggggcca agtgctggtg	600
ttcctgggtc agagtgaggg gctgaggtca cgtccctccc aggtcctgga cagccccttc	660
cccacaggct ctgcctttgg cttctccctt cgaggtgccg tagacatcga tgacaacgga	720
taccagacc tgatcgtggg agcttacggg gccaaccagg tggctgtgta cagagctcag	780
ccagtgggtga aggcctctgt ccagctactg gtgcaagatt cactgaatcc tgctgtgaag	840
agctgtgtcc tacctcag	858



BEST AVAILABLE COPY

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

Pour vous Informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)		32412/FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0307411
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt et protéine produite.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :  INSERM 101 rue de Tolbiac F-75654 PARIS Cedex 13 France  CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS 3 rue Michel-Ange F-75794 PARIS Cedex 16 France		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		MOUILLAC
Prénoms		Bernard
Adresse	Rue	4 Allée de la Calou
	Code postal et ville	31415101 SAUSSAN
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		SEN
Prénoms		Tuhnadri
Adresse	Rue	711/B Block P New Aipore
	Code postal et ville	700053 KOLKATA 700053, Inde
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		BANERES
Prénoms		Jean-Louis
Adresse	Rue	2 place des Lilas
	Code postal et ville	34101710 MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)  le 18 JUIN 2004  BREESE Pierre 921038		